

· 论 著 ·

Cenp-E 表达下调与 HepG-2 细胞染色体数目异常的关系研究

刘斌¹, 刘卓然¹, 翁亚光^{2△}, 刘子杰², 蔡燕²

(1. 南华大学附属第二医院, 湖南衡阳 421001; 2. 重庆医科大学检验系 400016)

摘要:目的 在人肝癌细胞(HepG-2 细胞)中研究纺锤体检查点蛋白 E(Cenp-E)的定位和作用。方法 用流式细胞术检测经诺考达唑处理后 HepG-2 细胞和正常肝细胞(LO2 细胞)周期的变化,用染色体分析方法检测两种细胞染色体数量及核型,用实时荧光定量-聚合酶链反应(RFQ-PCR)检测经诺考达唑处理后 HepG-2 细胞和 LO2 细胞中 Cenp-E mRNA 的表达水平,用间接免疫荧光技术观察两种细胞 Cenp-E 蛋白表达及定位,在 LO2 细胞中用 RNA 干扰(RNAi)技术进一步评价 Cenp-E 蛋白的功能。结果 诺考达唑处理后,使两种细胞有丝分裂均停留在 G₂/M 期;染色体分析结果显示 HepG-2 细胞中染色体数目异常细胞的比例高于 LO2 细胞($P < 0.05$);RFQ-PCR 显示诺考达唑处理后 LO2 细胞 Cenp-E mRNA 高于 HepG-2 细胞($P < 0.05$);间接免疫荧光技术显示 Cenp-E 定位于细胞核,诺考达唑处理后 LO2 细胞 Cenp-E 蛋白表达高于 HepG-2 细胞($P < 0.05$);转染质粒后,LO2 细胞中 Cenp-E mRNA 和蛋白的表达明显降低($P < 0.05$)。结论 Cenp-E 过低表达可能是肝癌细胞染色体数目异常重要原因之一。

关键词: 肝肿瘤;染色体;纺锤体检查点蛋白 E

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3340-02

Study on the relationship between the low expression of Cenp-E and chromosome numerical abnormality in HepG-2

Liu Bin¹, Liu Zuoran¹, Weng Yaguang^{2△}, Liu Zijie², Cai Yan²

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China;

2. Medical Chemical Laboratory of Analysis Department, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the role and localization of Cenp-E gene in HepG-2 cell. Methods The cell cycle changes of HepG-2 cell and LO2 cell synchronized by nocodazole were detected by flow cytometry. The chromosome assay was used to detect the number and karyotype of chromosome of HepG-2 cell and LO2 cell. Cenp-E mRNA expressions in HepG-2 cell and LO2 cell synchronized by nocodazole were detected by RFQ-PCR. In the mean while, Cenp-E protein localization and expressions in HepG-2 cell and LO2 cell were observed by indirect immunofluorescence. In the end, RNAi technology was used to further evaluate the function of Cenp-E in LO2 cell. Results HepG-2 cell and LO2 cell were arrested in G₂/M phase synchronized by nocodazole. The chromosome assay showed that the proportion of abnormal chromosomes cell in HepG-2 cell were higher than LO2 cell. After synchronized by nocodazole, Cenp-E mRNA and protein expressions of HepG-2 cell was higher than LO2 cell. Cenp-E mRNA and protein expressions of LO2 cell decreased significantly. Conclusion The low expression of Cenp-E may be one of the important reasons of chromosome numerical abnormality in human hepatoma cells.

Key words: liver neoplasms; chromosomes; spindle checkpoint protein E

早在 1914 年,德国科学家 Boveri 就认为恶性细胞有不稳定的染色体,这些不稳定染色体能导致癌症的发生。1998 年, Duesberg 等^[1]提出了非整倍体导致癌症发生的假说,他们的实验表明非整倍体是独立于基因突变外导致癌症发生的机制。纺锤体检查点蛋白 E(Cenp-E)功能丧失的一个后果是遗传不稳定性,促使细胞更容易恶变^[2]。本实验通过间接免疫荧光和 RNA 干扰(RNAi)技术在人肝癌细胞(HepG-2 细胞)和正常肝细胞(LO2 细胞)中研究 Cenp-E 在染色体数目异常发生过程中的作用。

1 材料与方

1.1 材料 HepG-2 细胞和 LO2 细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,抗体购自 Santa Cruz 公司,4',6-二脒基-2-苯基咪唑(4',6-diamidino-2-phenylindole, DIPA)染料购自 Sigma 公司,TRIzol、PrimeScript RT 试剂盒购自 Takara 公司,质粒抽提试剂盒、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 短发夹 RNA(shRNA)设计及质粒的构建 用 Invitrogen 公司在线设计软件,设计以 GenBank 中 Cenp-E 基因(编号:NM001813)的编码区(CDS)为靶向的 shRNA 引物,送上海 Invitrogen 公司采用化学合成方法合成单链寡核苷酸,退火形成双链 DNA,插入线性载体 pgenesil-1 质粒中,双酶切鉴定和

DNA 测序分析。

1.3 转染质粒到 LO2 细胞 将 LO2 细胞传代到 24 孔板内。培养后将细胞分为 3 组:(1) pshRNA-Cenp-E-1 + Lipofectamine 2000(实验组);(2) pgenesil-1 + Lipofectamine 2000(对照组);(3) ddH₂O + Lipofectamine 2000(空白组)。

1.4 实时荧光定量-聚合酶链反应(RFQ-PCR) 分别收集未转染和转染 48 h 后的细胞,提取 RNA,反转录为 cDNA。用已经制备好的 Cenp-E 和 GAPDH(内参)定量检测的引物和探针,在 ABI7000 定量 PCR 仪上进行 RFQ-PCR 扩增,比较各组细胞内 Cenp-E mRNA 的水平(Cenp-E mRNA 拷贝数/GAPDH mRNA 拷贝数)。

1.5 间接免疫荧光检测 首先在 24 孔板中制备细胞玻片,然后用预温到 37 °C 的磷酸二氢盐缓冲液(PBS)清洗细胞表面 3 次。用 -20 °C 的甲醇固定 20 min,10%羊血清封闭 30 min。加入兔抗人 Cenp-E 抗体 37 °C 孵育 120 min,于暗室中加入羊抗兔二抗,37 °C 孵育 60 min,加入 DAPI,37 °C 孵育 5 min。以上每步用 PBS 洗 3 次,50%甘油封片进行激光共聚焦检测。

1.6 细胞周期分析 用 100 ng/mL 诺考达唑同时处理 HepG-2 和 LO2 细胞 6~12 h,PBS 清洗 3 遍后,加入 PBS 配制的 75%冰乙醇,4 °C 过夜,送重庆医科大学儿科医学研究所

△ 通讯作者, Tel:13708316932; E-mail: yaguangweng@126.com。

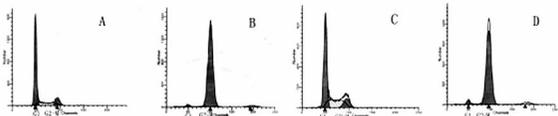
进行细胞周期分析。

1.7 染色体分析 将已长满 80% LO2 细胞和 HepG-2 细胞放入 4 °C 冰箱中 6~12 h, 然后加入秋水仙素, 37 °C 孵箱继续培养 6~10 h。收集细胞, 2 500 r/min 离心 5 min, 加入预加温到 37 °C 的 0.075 mol/L 氯化钾(KCl) 8 mL, 37 °C 水浴 15 min, 加 300 μL 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), 2 500 r/min 离心 5 min, 重悬, 4 °C 过夜, 2 000 r/min 离心 5 min, 此步骤重复 2 次。弃上清液, 加 500 μL 固定液混匀, 制片晾干, 用吉姆萨染色镜检。分析两种细胞各 100 个 G₂/M 期细胞分裂像。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学处理, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

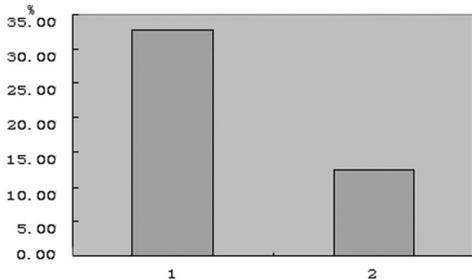
2.1 细胞周期分析的流式结果 诺考达唑处理前 HepG-2 细胞和 LO2 细胞 G₂/M 期细胞的比例分别为 0.125 0±0.028 7 和 0.096 7±0.024 1, 二者比较差异无统计学意义(*P*>0.05); 诺考达唑处理后两种细胞的 G₂/M 期细胞比例较处理前明显增加(*P*<0.05), 分别为 0.978 3±0.218 0 和 0.954 3±0.275 0, 但二者比较差异无统计学意义(*P*>0.05), 见图 1。



A: LO2 细胞诺考达唑处理前; B: LO2 细胞诺考达唑处理后; C: HepG-2 细胞诺考达唑处理前; D: HepG-2 细胞诺考达唑处理后。

图 1 HepG-2 和 LO2 细胞用诺考达唑处理前、后的流式细胞仪检测结果

2.2 染色体分析结果 统计分析 HepG-2 细胞和 LO2 细胞各 100 个 G₂/M 细胞的分裂像, 结果显示 HepG-2 细胞中染色体数目异常细胞的比例高于 LO2 细胞(*P*<0.05), 见图 2, 细胞吉姆萨染色后光镜观察见图 3。



1: HepG2 细胞; 2: LO2 细胞。

图 2 HepG-2 细胞和 LO2 细胞异常染色体的结果

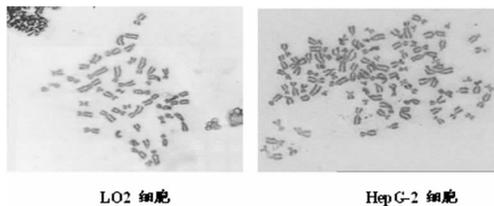


图 3 吉姆萨染色结果照片(光镜×400)

2.3 RFQ-PCR 结果

2.3.1 诺考达唑处理后 LO2 细胞和 HepG-2 细胞 Cenp-E mRNA 水平比较 诺考达唑处理前 HepG-2 细胞 Cenp-E mRNA 水平为 0.097 8±0.027 3, LO2 细胞 Cenp-E mRNA 水平为 0.098 6±0.026 1, 二者比较差异无统计学意义(*P*>0.05); 诺考达唑处理后 LO2 细胞 Cenp-E mRNA 水平为 0.184 5±0.034 5, 明显高于 HepG-2 细胞(0.108 2±0.020 3), 差异有

统计学意义(*P*<0.05)。

2.3.2 转染质粒到 LO2 细胞后各组 Cenp-E mRNA 水平比较 实验组 Cenp-E mRNA 水平为(1.2±0.1)×10⁻², 对照组 Cenp-E mRNA 水平为(8.8±0.1)×10⁻², 空白组 Cenp-E mRNA 水平为(9.8±0.1)×10⁻², 实验组与其他两组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.4 间接免疫荧光检测结果

2.4.1 诺考达唑处理后 HepG-2 细胞和 LO2 细胞间接免疫荧光检测结果 HepG-2 细胞的细胞核中, Cenp-E 蛋白的表达量明显低于 LO2 细胞(*P*<0.05), 见图 4、5。

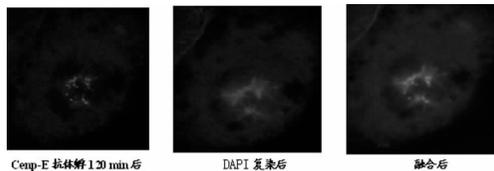


图 4 诺考达唑处理后 HepG-2 细胞间接免疫荧光检测结果

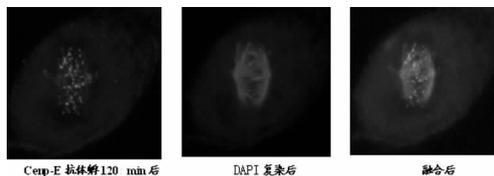


图 5 诺考达唑处理后 LO2 细胞间接免疫荧光检测结果

2.4.2 转染质粒到 LO2 细胞前、后 Cenp-E 蛋白间接免疫荧光检测结果 转染质粒到 LO2 细胞后, Cenp-E 蛋白表达下降(*P*<0.05), 见图 6、7。

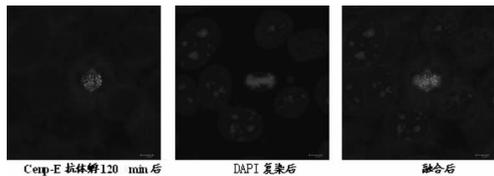


图 6 转染质粒到 LO2 细胞前间接免疫荧光检测结果



图 7 转染质粒到 LO2 细胞后间接免疫荧光检测结果

3 讨 论

Cenp-E 是一种重要着丝粒特异蛋白, 它主要定位于着丝粒的外层。国外学者发现 Cenp-E 的细胞内水平和定位皆受到严格控制^[3]。现在越来越多的实验证明 Cenp-E 在纺锤体检查点(spindle checkpoint, SCP)机制中起着非常重要的作用, 一定量的 Cenp-E 水平, 对 SCP 的激活起到非常重要的作用。Cenp-E 在着丝粒的定位受到着丝粒组装的上游蛋白质如着丝粒蛋白-H(centromere protein-H, CENP-H)的影响^[4]。在 SCP 机制中, Cenp-E 主要是通过自身的结构变化影响 BubR1 蛋白的功能而起作用^[5]。

有研究发现在许多癌细胞中有异常的 SCP 功能。例如, Mad2 蛋白表达降低见于鼻咽癌、肝细胞癌、人乳腺癌及其一些乳腺癌细胞系和卵巢癌等^[6]; Bub1 蛋白降低也见于结肠癌和急性粒细胞性白血病^[7]; 高水平 Bub1、BubR1 和 Bub3 蛋白的表达也与胃癌细胞增殖能力密切相关^[8]。但 Cenp-E 与肿瘤之间的关系还不明确。(下转第 3345 页)

pholipase C that is regulated by Gal2 and stimulates the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Biol Chem*, 2001, 4(276):2758-2765.

- [6] Kelly GG, Sarah ER, Ondrako JM, et al. Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector [J]. *EMBO J*, 2001, 4(20):743-754.
- [7] 郭永灿, 罗春丽, 蔡晓钟, 等. 磷脂酶 C ϵ 基因在膀胱移行细胞癌中表达及其临床意义 [J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(1):52-54.
- [8] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, et al. Crucial role of phospholipase C epsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24):8808-8810.
- [9] Bourguignon LY, Gilad E, Brightman A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ signaling and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(20):14026-14040.
- [10] Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, et al. Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in phospho-

lipase C ϵ -knockout mice is associated with decreased cell death [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10):1897-1902.

- [11] 韩镇远, 钟甘平, 李向前, 等. 膀胱移行细胞癌组织中 Hec 1, Cyclin D1 的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2010, 50(10):72-73.
- [12] 张长江, 高永生, 黄克岭, 等. 凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在膀胱移行细胞癌中的表达 [J]. *中国综合临床*, 2010, 26(3):311-312.
- [13] Vanage DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets from part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis [J]. *Br J Haematol*, 1997, 99(4):824-831.
- [14] Maung Z, Macleam F, Reid M, et al. The relationship between Bcl-2 expression and response to chemotherapy in liver cancer [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 11(2):104-109.
- [15] Cheng YC, Chen LM, Chang MH, et al. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 325(1/2):15-23.

(收稿日期:2011-09-21 修回日期:2011-10-20)

(上接第 3341 页)

Cenp-E 基因在细胞 G₂/M 期高表达, 在细胞间期基本不表达, 诺考达唑处理可以使 HepG-2 细胞和 LO2 细胞同步在 G₂/M 期的细胞基本一样多, 便于在同一水平分析 Cenp-E 基因在二者之间的差异, 本研究结果也表明诺考达唑处理后 HepG-2 细胞和 LO2 细胞同步在分裂期的细胞基本一样多。诺考达唑处理之前, HepG-2 细胞 Cenp-E mRNA 量略高于 LO2 细胞, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示未经诺考达唑处理, 两种细胞 G₂/M 细胞所占比较低, Cenp-E mRNA 的表达差异难以显现; 诺考达唑处理后 LO2 细胞 Cenp-E mRNA 和蛋白水平明显高于 HepG-2 细胞 ($P < 0.05$), 提示 LO2 细胞在分裂期对 Cenp-E 表达的应激上调能力高于 HepG-2 细胞, HepG-2 细胞分裂期 Cenp-E 表达为相对缺乏, 从而引起 SCP 监控功能缺陷, 导致 G₂/M 期纺锤丝与染色体着丝粒未全部正常连接时细胞即进入后期, 引起细胞染色体数目异常。作者进一步通过构建 Cenp-E shRNA 载体转染到 LO2 细胞中, 通过间接免疫荧光检测发现, Cenp-E 蛋白表达在被转染的细胞中明显下降, 进一步说明 Cenp-E 表达降低直接或间接影响着丝粒的正确装配, 最终导致染色体数目异常, 细胞出现癌前病变^[9]。但 Cenp-E 具体怎样参与细胞染色体异常过程还不是很清楚。

本研究从一个侧面反映肝癌细胞 G₂/M 期 Cenp-E 蛋白表达应激性的增高能力明显低于 LO2 细胞, 提示 Cenp-E 的相对缺乏可能是 HepG-2 细胞染色体数目异常形成的原因之一, 为进一步探明 Cenp-E 在肿瘤发生中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Duesberg P, Rausch C, Rasrck D, et al. Genetic instability of cancer cell is proportional to their degree of aneuploidy [J]. *Proc Natl Acadsci USA*, 1998, 95(23):13692-

13697.

- [2] 丛文铭, 吴孟超. 肝癌基因组不稳定性的研究现状与展望 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 1(23):5-8.
- [3] Pan J, Chen RH. Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(12):1439-1451.
- [4] Orthaus S, Ohndorf S, Diekmann S. RNAi knockdown of human kinetochore protein CENP-H [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(1):36-46.
- [5] Maia AF, Lopes CS, Sunkel CE. BubR1 and CENP-E have antagonistic effects upon the stability of microtubule-kinetochore attachments in *Drosophila* S2 cell mitosis [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(11):1367-1378.
- [6] Fraschini R, Beretta A, Sironi L, et al. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores [J]. *EMBO J*, 2001, 20:6648-6659.
- [7] Chung E, Chen RH. Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5:748-753.
- [8] Tang Z, Shu H, Oncel D, et al. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2004, 16(3):387-397.
- [9] Liu D, Zhang N, Du J, et al. Interaction of Skp1 with CENP-E at the midbody is essential for cytokinesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1):394-402.

(收稿日期:2011-06-10 修回日期:2010-09-10)